

**This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record**

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

**Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.**

**Defects in the images may include (but are not limited to):**

- **BLACK BORDERS**
- **TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- **FADED TEXT**
- **ILLEGIBLE TEXT**
- **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- **COLORED PHOTOS**
- **BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS**
- **GRAY SCALE DOCUMENTS**

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**

L2 ANSWER 1 OF 1 CA COPYRIGHT 2003 ACS  
 AN 121:253903 CA  
 TI Manufacture of optically active alcohols with Pseudomonas  
 IN Nikaido, Teruyuki; Kawada, Naoki  
 PA Daicel Chem, Japan  
 SO Jpn. Kokai Tokkyo Koho, 11 pp.  
 CODEN: JKXXAF  
 DT Patent  
 LA Japanese  
 FAN.CNT 1

	PATENT NO.	KIND	DATE	APPLICATION NO.	DATE
PI	JP 06209781	A2	19940802	JP 1993-12205	19930128 <--
	JP 3184651	B2	20010709		
	JP 2001245692	A2	20010911	JP 2001-61391	20010306
	JP 3283254	B2	20020520		
PRAI	JP 1992-318400	A1	19921127		
	JP 1993-12205	A3	19930128		

OS MARPAT 121:253903  
 AB Enantiomeric mixts. of R(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>CH(OH)CH<sub>2</sub>OH (I) or Me(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CH(NH<sub>2</sub>)CH<sub>2</sub>OH.  
 (II)  
 (R = H, NH<sub>2</sub>, Cl, Br, I, CH<sub>2</sub>OH; m = 1-5; n = 0-3) are treated with cells  
 or  
 preps. of Pseudomonas, which act upon I or II to manuf. residual  
 optically active alcs. R(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>CH(OH)CH<sub>2</sub>OH or Me(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CH(NH<sub>2</sub>)CH<sub>2</sub>OH (R, m,  
 n  
 = same as above). Thus, Pseudomonas sp. TRP-13 was shake-cultured in a  
 medium contg. (RS)-1,2-propanediol, meat ext., yeast ext., polypeptone,  
 and salts at 30.degree. and pH 7.2 for 48 h, centrifuged, and the cells  
 were treated with (RS)-1,2-butanediol at 30.degree. for 24 h to manuf.  
 60%  
 (R)-1,2-butanediol with 95.4% e.e. The microbial properties of the  
Pseudomonas sp. are described.  
 IC ICM C12P007-18  
 ICS C12P041-00  
 ICI C12P007-18, C12R001-38; C12P007-18, C12R001-40; C12P041-00, C12R001-38;  
 C12P041-00, C12R001-40  
 CC 16-5 (Fermentation and Bioindustrial Chemistry)  
 ST chiral alc manuf Pseudomonas; resoln diol Pseudomonas; amino alc resoln  
Pseudomonas  
 IT Pseudomonas  
Pseudomonas putida  
 (chiral alcs. manuf. with Pseudomonas from racemic alcs.)  
 IT Resolution  
 (biochem., chiral alcs. manuf. with Pseudomonas from racemic alcs.)  
 IT 5856-63-3P 35320-23-1P 40348-66-1P 60827-45-4P, (S)-3-Chloro-1,2-  
 propanediol 66211-46-9P 70005-88-8P 108340-61-0P 130232-55-2P  
 RL: BMF (Bioindustrial manufacture); BIOL (Biological study); PREP  
 (Preparation)  
 (chiral alcs. manuf. with Pseudomonas from racemic alcs.)  
 IT 6810-31-7 13054-87-0 13552-31-3 16369-14-5 26171-83-5  
 52340-46-2  
 91049-43-3 112254-74-7  
 RL: RCT (Reactant); RACT (Reactant or reagent)  
 (chiral alcs. manuf. with Pseudomonas from racemic alcs.)

=>

103 at least

L1 ANSWER 1 OF 1 WPIDS (C) 2003 THOMSON DERWENT  
 AN 1994-282571 [35] WPIDS  
 CR 2001-610080 [67]  
 DNC C1994-128568  
 TI High purity prepn. of optically active alcohol(s), useful for LC's, agrochemicals, etc. - by reacting Pseudomonas microorganism on enantiomeric mixt. of alkyl di ol and alkylamino alcohol.  
 DC B05 C03 D16 E19 L03  
 PA (DAIL) DAICEL CHEM IND LTD  
 CYC 1  
 PI JP 06209781 A 19940802 (199435)\* 11p <--  
 JP 3184651 B2 20010709 (200140) 12p  
 ADT JP 06209781 A JP 1993-12205 19930128; JP 3184651 B2 JP 1993-12205 19930128  
 FDT JP 3184651 B2 Previous Publ. JP 06209781  
 PRAI JP 1992-318400 19921127  
 AB JP 06209781 A UPAB: 20011203  
 Prepn. of optically active alcohols comprises reacting a Pseudomonas microorganism(s) and/or its treated prod. capable of acting on a mixt. of enantiomers of formula (CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>CHOHCH<sub>2</sub>OH (I) and/or CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CH(NH<sub>2</sub>)CH<sub>2</sub>OH (II) to leave alcohols of formula (III) and/or (IV) on the enantiomer mixt. to obtain the alcohols (III) and/or (IV). R is H, NH<sub>2</sub>, Cl, Br, I or -CH<sub>2</sub>OH; m is 1-5; and n is 0-3.  
 USE/ADVANTAGE - Provides optically active prods. typically with 60-99% yields and 90% or higher. The obtd. alcohols are useful for liq. crystals and as synthetic raw materials for drugs and agrochemicals, such as antibiotics, antimicrobial agents, calcium antagonists and antituberculosis agents.  
 In an example, medium comprising 1.0% of racemic 1,2-propanediol, 0.1% of meat extract, 0.1% of yeast extract, 0.2% of polypeptone, 0.07% of KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.13% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> and 0.05% MnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O and having pH of 7.2 was sterilised at 121 deg. C for 15 minutes on which, after cooling, preculture liq. of Pseudomonas sp. TRP-13 was inoculated. After 48 hr. culture with shaking at 30 deg. C, cells were collected by centrifugation.  
 Live cells were suspended in deionised water to final vol. of 25 mL.  
 Then, 500 mM of solns. of racemic alcohol, such as 1,2-butanediol, 1,2,4-butanetriol, 3-chloro-1,2-propanediol, 2-amino-1-propanol or 3-amino-1,2-propanediol, having pH adjusted to pH 7 were prepd. 2.5 mL of the cell suspension, 2.5 ml of the substrate soln. and 0.05g of CaCO<sub>3</sub> were mixed together and reacted with shaking at 30 deg. C in 21-mm test tube for 12-24 hrs. Cells were than removed by centrifugation to obtain supernatant. The optical purity and yield of alcohol and its enantiomers were e.g. 60% and 95.4% ee, respectively, for 1,2-butanediol, 93% and 99.0% ee or higher for 1,2,6-hexanetriol, 90% and 51.2% ee for 2-amino-1-propanol and 100% and 43.5% ee for 3-amino-1,2-propanediol. The purity measured by HPLC.  
 Dwg.0/0

# PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 06-209781

(43)Date of publication of application : 02.08.1994

(51)Int.Cl.

C12P 7/18  
C12P 41/00  
// (C12P 7/18  
C12R 1:38 )  
(C12P 7/18  
C12R 1:40 )  
(C12P 41/00  
C12R 1:38 )  
(C12P 41/00  
C12R 1:40 )

(21)Application number : 05-012205

(71)Applicant : DAICEL CHEM IND LTD

(22)Date of filing : 28.01.1993

(72)Inventor : NIKAIDO TERUYUKI  
KAWADA NAOKI

(30)Priority

Priority number : 04318400 Priority date : 27.11.1992 Priority country : JP

## (54) PRODUCTION OF OPTICALLY ACTIVE ALCOHOL

(57)Abstract:

PURPOSE: To readily obtain an optically active alcohol of high optical purity by reacting a specific microorganism belonging to the genus *Pseudomonas* or its treated substance with an enantiomeric mixture of an alcohol.

CONSTITUTION: A microorganism [*Pseudomonas putida* TRB-2 (FERM BP-3879) or TRB-4 (FERM BP-3880), a new microorganism TRP-13 (FERM BP-3882) of the genus *Pseudomonas*, etc.] capable of acting on an enantiomeric mixture of an alcohol expressed by formula I or II [R is H, NH<sub>2</sub>, etc.; (m) is an integer of 1-5; (n) is an integer of 0-3] and making an optically active alcohol expressed by formula III or IV remain

is made to react with the enantiomeric mixture of the alcohol expressed by formula I or II. The microbial cell may be a live microbial cell, a crushed microbial cell, a microbial cell treated with acetone or a freeze-dried microbial cell, etc.



## LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 19.05.1999

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number] 3184651

[Date of registration] 27.04.2001

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

(19)日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11)特許出願公開番号

特開平6-209781

(43)公開日 平成6年(1994)8月2日

(51)Int.Cl.<sup>5</sup> 識別記号 庁内整理番号 FI 技術表示箇所  
C 1 2 P 7/18 7432-4B  
41/00 H 8931-4B  
// (C 1 2 P 7/18  
C 1 2 R 1:38)  
(C 1 2 P 7/18

審査請求 未請求 請求項の数 1 OL (全 11 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願平5-12205

(22)出願日 平成5年(1993)1月28日

(31)優先権主張番号 特願平4-318400

(32)優先日 平4(1992)11月27日

(33)優先権主張国 日本(JP)

(71)出願人 000002901

ダイセル化学工業株式会社

大阪府堺市鉄砲町1番地

(72)発明者 二階堂 輝之

茨城県つくば市花畑2-13-12-508

(72)発明者 河田 直紀

茨城県つくば市千現1-14-14-304

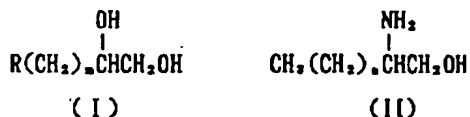
(74)代理人 弁理士 古谷 馨 (外3名)

(54)【発明の名称】 光学活性アルコールの製法

(57)【要約】

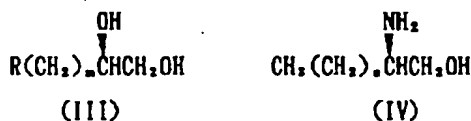
【構成】 シュードモナス属に属し、式(I)又は(II)で表わされるアルコールのエナンチオマー混合物に作用し、式(III)又は(IV)で表わされる立体配置のアルコールを残存させる能力を有する微生物あるいはその処理物を、式(I)又は(II)で表わされるアルコールのエナンチオマー混合物に作用させ、残存する式(III)又は(IV)で表わされる立体配置をもつアルコールを採取して光学活性アルコールを得る。

【化1】



(式中、RはH、NH<sub>2</sub>、Cl、Br、I又はCH<sub>2</sub>OH、mは1～5の整数、nは0～3の整数を示す。)

【化2】



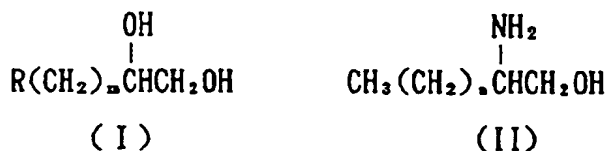
(式中、R、m、nは前記と同じ意味を示す。)

【効果】 簡便に光学純度の高い光学活性アルコールを製造することを可能にさせるものであり、工業的に極めて有利である。

## 【特許請求の範囲】

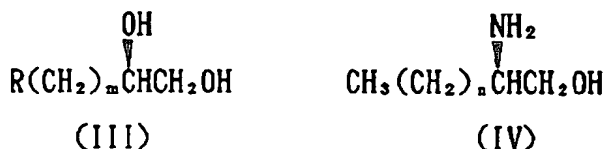
【請求項1】 シュードモナス属に属し、式(I)又は(II)で表わされる構造のアルコールのエナンチオマー混合物に作用し、式(III)又は(IV)で表わされる立体配置をもつアルコールを残存させる能力を有する微生物、あるいはその処理物を、式(I)又は(II)で表わされるアルコールのエナンチオマー混合物に作用させ、残存する式(III)又は(IV)で表わされる立体配置をもつアルコールを採取することを特徴とする光学活性アルコールの製法。

## 【化1】



(式中、RはH、NH<sub>2</sub>、Cl、Br、I又は-CH<sub>2</sub>OH、mは1～5の整数、nは0～3の整数を示す。)

## 【化2】



(式中、R、m、nは前記と同じ意味を示す。)

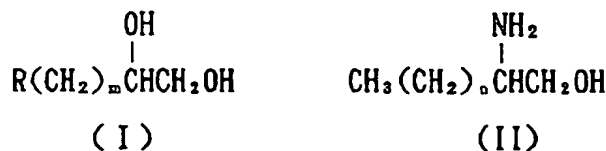
## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は光学活性アルコールの製造法に関する。さらに詳しくは、式(I)又は(II)で表わされる構造のアルコールのエナンチオマー混合物に作用し、式(III)又は(IV)で表わされる立体配置をもつアルコールを残存させる能力を有する微生物あるいはその処理物を作用させ、残存する式(III)又は(IV)で表わされる立体配置をもつアルコールを採取することを特徴とする光学活性アルコールの製造法に関する。

## 【0002】

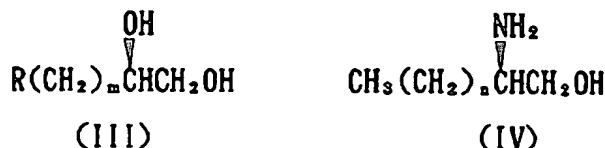
## 【化3】



【0003】 (式中、RはH、NH<sub>2</sub>、Cl、Br、I又は-CH<sub>2</sub>OH、mは1～5の整数、nは0～3の整数を示す。)

## 【0004】

## 【化4】



【0005】 (式中、R、m、nは前記と同じ意味を示す。)

式(III)又は(IV)で表わされる光学活性アルコールは液晶、種々の医薬品、例えば抗生物質、抗菌剤、カルシウム拮抗剤、抗結核剤等の重要合成原料である。

## 【0006】

【従来の技術及び発明が解決しようとする課題】 従来、前記式(III)又は(IV)で表わされる光学活性アルコールを製造する方法として、アルキル鎖の1,2-ジオールについては、1-ヒドロキシケトンを経由してパン酵母を用いて不斉還元し、光学活性1,2-ジオールを得る方法(Guetteら、Bull. Soc. Chim. Fr., (11), 4217-24, 1972)、また、酵素を用いる方法としては1,2-ジオールのエナンチオマー混合物にリパーゼを作用させて、エステル交換反応あるいはエステル合成反応によって光学分割する方法(Cambouら、J. Am. Chem. Soc., 106, 2687-92, 1984)、グリセロールデヒドロゲナーゼを用いて1-ヒドロキシ-2-ブタノンを還元して(R)-1,2-ブタンジオールを、1,2-ブタンジオールのエナンチオマー混合物に該酵素を作用させ(S)-1,2-ブタンジオールを残存させる方法(Leeら、J. Org. Chem., 51, 25-36, 1986)などが知られている。また、特開平2-128699号公報において、(S)-1,2-ジオールの製法として1,2-ブタンジオール以上の鎖長の直鎖の1,2-ジオールについて1,2-ジオールのエナンチオマー混合物に微生物を作用させ、光学純度の高い(S)-1,2-ジオールを採取する方法が開示されている。また、Kawaharaらも1,2-ジオールのエナンチオマー混合物に酵母を作用させて(S)-1,2-ジオールを残存させる方法を報告しているが(J. Mol. Catal., 60, L33-L35, 1990)、いずれも(S)-1,2-ジオールであり、R体の製法は記載されていない。

【0007】 光学活性トリオール類については、1,2,4-ブタントリオールは(R)あるいは(S)-りんご酸エステルを還元して調製する方法(例えばTandonら、J. Org. Chem., 40, 2767-9, 1983)、L-エリスルロースから(R)-1,2,4-ブタントリオールを合成する方法(Van der Eyckenら、Tetrahedron Lett., 28, 4759-60, 1987)が知られているのみである。また、1,2,6-ヘキサントリオールは(S)体をD-グルコノ-1,5-ラクトンより調製する方法が知られているのみである(Regelingら、Carbohydr. Res., 216, 79-91, 1991)。

【0008】 光学活性3-ハロゲノ-1,2-プロパンジオールについては、特開昭62-122596号、同62-122597号、同62-158494号各公報において種々の微生物をラセ

ミ体3-クロロ-1,2-プロパンジオールに作用させて、残存する光学活性3-クロロ-1,2-プロパンジオールを採取する方法が開示されているが、シュードモナス属微生物を用いた場合、R体が残存しており、S体を残存させる株は記載されていない。また、特開平3-191794号公報においても、やはりラセミ体3-クロロ-1,2-プロパンジオールよりシュードモナス属微生物を用いて(R)-3-クロロ-1,2-プロパンジオールを製造する方法が開示されているが、S体の記載はない。すなわち、シュードモナス属に属する微生物を3-ハログノ-1,2-プロパンジオールのエナンチオマー混合物に作用させて、(S)-3-ハログノ-1,2-プロパンジオールを残存させ、これを採取する方法は今までまったく知られていなかった。

【0009】光学活性2-アミノアルコールの製法については、2-アミノ-1-ブタノールの場合、光学活性酒石酸やL-グルタミン酸、L-マンデル酸などを用いて光学分割する方法(例えばPitreら、Chimia, 23, 399-400, 1969)、N-アシル-(R, S)-2-アミノ-1-ブタノールにアシラーゼを作用させて、(S)-2-アミノ-1-ブタノールを採取する方法(DE 24463 20、特開昭58-198296号)、ラセミ体2-アミノ-1-ブタノールにリパーゼを作用させてN-カルバミル-2-アミノ-1-ブタノールを合成して光学分割する方法(EP 222561)、あるいは逆にN-カルバミル-2-アミノ-1-ブタノールアセテートに酵素を作用させて光学分割する方法(EP 239122)、リパーゼを用いてエステル交換で光学分割する方法(Bevinakattiら、Tetrahedron Asymmetry, 1, 583-6, 1990)、3-アシル-4-エチル-2-オキサゾロンを(+)-DIOP-RhCl触媒を用いて還元する方法(US 4150030)などが知られている。

【0010】2-アミノ-1-プロパノールについてはDあるいはL-アラニンエステルを還元する方法(例えばCS 209151)、2-アミノ-1-プロパノールのエナンチオマー混合物に馬肝臓由来のアルコールデヒドロゲナーゼを作用させ、(R)-2-アミノ-1-プロパノールを残存させる方法(Matosら、Bioorg. Chem., 13, 121-130, 1985)が知られている。

【0011】また、3-アミノ-1,2-プロパンジオールについては、光学活性2-(6-メトキシ-2-ナフチル)プロピオン酸を用いて光学分割する方法(Arch. Pharm., 319, 193-5, 1986)、グリセリンとN,N-ジイソプロピル-10-カンファースルホンアミドとケタールを作らせた後、NaH/PhCH<sub>2</sub>Brを反応させ、(S)-1-(ベンゾイルオキシ)-2,3-プロパンジオールにした後、(R)-3-アミノ-1,2-プロパンジオールに誘導する方法(Hsuら、Tetrahedron Asymmetry, 1, 219-20, 1990)、N-アセチル-DあるいはL-アラニンで光学分割する方法(DE 2943444)などが知られている。

【0012】以上述べたように、前記式(I)又は(I')で表されるアルコールのエナンチオマー混合物にシュードモナス属の微生物を作用させ、式(III)又は(I'V)で表される立体配置をもつ光学活性アルコールを残存させ、残存する光学活性アルコールを採取する方法は、今までまったく知られていなかった。

【0013】

【課題を解決するための手段】本発明者等は経済的に優れ、かつ簡便な方法で光学純度の高い、前記式(III)又は(IV)で表わされる光学活性アルコールを得る方法として、微生物を作用させる方法に着目し、この目的に適した微生物を広く自然界より検索した結果、シュードモナス属に属する微生物群から選ばれた微生物が、式

(I)又は(II)で表わされるアルコールのエナンチオマー混合物に作用し、式(III)又は(IV)で表わされる光学活性アルコールを残存させることを見出し、本発明を完成したものである。

【0014】すなわち本発明は、シュードモナス属に属し、式(I)又は(II)で表わされる構造のアルコールのエナンチオマー混合物に作用し、式(III)又は(IV)で表わされる立体配置をもつアルコールを残存させる能力を有する微生物、あるいはその処理物を、式(I)又は(II)で表わされるアルコールのエナンチオマー混合物に作用させ、残存する式(III)又は(IV)で表わされる立体配置をもつアルコールを採取することの特徴とする光学活性アルコールの製法、およびシュードモナス属に属し、かつ、式(I)又は(II)で表されるアルコールのエナンチオマー混合物に作用し、立体的に一方のエナンチオマーのアルコールを代謝、分解する能力を有する微生物群から選ばれる新規な微生物を提供する。

【0015】本発明で用いられる式(I)で表されるアルコールとしては、例えば、1,2-ブタンジオール、1,2-ペンタンジオール、1,2-ヘキサンジオールなどのジオール類、1,2,4-ブタントリオール、1,2,5-ペンタントリオール、1,2,6-ヘキサントリオールなどのトリオール類、3-クロロ-1,2-プロパンジオール、3-ブロモ-1,2-プロパンジオールなどのハログノアルコール類、3-アミノ-1,2-プロパンジオール等のアミノアルコール類が挙げられる。また式(II)で表されるアルコールとしては2-アミノ-1-プロパノール、2-アミノ-1-ブタノール、2-アミノ-1-ペンタノールなどが挙げられる。

【0016】本発明に使用する微生物としては、シュードモナス属(Pseudomonas)に属し、式(I)又は(II)で表わされるアルコールのエナンチオマー混合物に作用し、式(III)又は(IV)で表わされる光学活性アルコールを残存させる能力を有する限り、特に制限されない。具体的には、シュードモナス プチダ(Pseudomonas putida) TRB-2、TRP-4、シュードモナス スピ

ーシズ (*Pseudomonas* sp.) TRP-13株などが挙げられる。これらの微生物は、野性株、変異株、または細胞融合、もしくは遺伝子操作などの遺伝的手法により誘導される組み換え株など、いずれの株でも好適に用いることができる。また、これらの微生物は、少なくとも一種使用すればよい。

【0017】シュードモナス プチダ (*Pseudomonas putida*) TRB-2、TRP-4、シュードモナス スピ  
ーシズ (*Pseudomonas* sp.) TRP-13は、本発明者等が

自然界より分離したもので、式(I)又は(II)で表わされるアルコールのエナンチオマーの一方のみを立体特異的に代謝、分解する能力の高い菌株であり、それぞれ  
微工研条寄第3879号 (FERM BP-3879)、微工研  
条寄第3880号 (FERM BP-3880)、微工研条寄第  
3882号 (FERM BP-3882)として、1992年6月3  
日に工業技術院微生物工業技術研究所に国際寄託されて  
いる。以下にそれらの菌学的性質を示す。

## 【0018】

TRB-2株 TRP-4株 TRP-13株

## (a) 形態

## (1) 細胞の形および大きさ

桿菌	桿菌	桿菌
0.5~0.6 $\mu\text{m}$ $\times 1.5\sim 4.0 \mu\text{m}$	0.6~0.8 $\mu\text{m}$ $\times 1.0\sim 3.5 \mu\text{m}$	0.5 $\mu\text{m} \times$ 1.0~2.5 $\mu\text{m}$

## (2) 運動性

+

+

+

## (3) グラム染色性

-

-

-

## (4) 胞子の有無

-

-

-

## (5) 鞭毛

極鞭毛、>1 極鞭毛、>1 極鞭毛、1

## (b) 生理学的性質

## (1) オキシダーゼ

+

+

+

## (2) カタラーゼ

+

+

+

## (3) アミノペプチダーゼ

+

+

+

## (4) インドールの生成

-

-

-

## (5) VPテスト

-

-

-

## (6) 硝酸塩の還元

-

-

+

## (7) 脱窒反応

-

-

+

## (8) ウレアーゼ

±

N. T.

N. T.

## (9) フェニルアラニンデアミナーゼ

-

-

-

## (10) シュクロースからレバンの生成

-

-

-

## (11) レシチナーゼ

-

-

-

## (12) チロシンの分解

+

+

N. T.

## (13) でんぷんの加水分解

-

-

-

## (14) ゼラチンの加水分解

-

-

-

## (15) カゼインの加水分解

-

-

-

## (16) DNAの加水分解

-

-

-

## (17) Tween80 の加水分解

-

-

-

## (18) エスクリンの加水分解

-

-

+

## (19) 3% KOH による溶菌

+

+

+

## (20) 酸素に対する態度

好氣的

好氣的

好氣的

## (21) 4℃での生育

-

-

-

## (22) 37℃での生育

+

-

+

## (23) 41℃での生育

-

-

-

## (24) pH5.6 での生育

+

+

+

## (25) Mac-Conkey-Agar 培地での生育

+

+

+

## (26) SS-Agar 培地での生育

+

+

+

## (27) Cetrimid-Agar 培地での生育

+

+

+

## (28) 色素の生成

## 蛍光性

+

+

-

## ピロシアニン

-

-

-

## (29) OFテスト

O

O

O



(30) グルコースからガスの生成	—	—	—
(31) 酸の生成			
グルコース	+	+	+
フルクトース	+	+	+
キシロース	+	+	+
(32) PNPG ( $\beta$ -ガラクトシダーゼ)	—	—	—
(33) アルギニンジヒドロラーゼ	+	+	+
(34) 炭素源の利用			
酢酸	+	+	+
アジピン酸	—	—	+
カプロン酸	+	+	+
クエン酸	+	+	+
グリコール酸	+	—	—
レブリン酸	—	+	N. T.
リンゴ酸	+	+	+
マロン酸	+	—	—
フェニル酢酸	—	+	+
L-アラビノース	+	—	—
フルクトース	+	+	N. T.
グルコース	+	±	+
マンノース	+	—	—
マルトース	—	—	—
キシロース	+	—	—
マンニトール	+	—	—
グルコン酸	+	—	±
2-ケトグルコン酸	+	—	N. T.
N-アセチルグルコサミン	—	—	±
L-セリン	+	+	—
D-酒石酸	+	—	N. T.
馬尿酸	+	—	N. T.
L-酒石酸	+	—	N. T.
m-酒石酸	—	+	N. T.
エタノール	+	—	+
乳酸	+	+	+
スベリン酸	—	—	—
ベンジルアミン	+	—	N. T.
アドニトール	+	—	—
酪酸	+	N. T.	+
D-マンデル酸	—	—	N. T.
トレハロース	—	—	—
D-グルカル酸	—	N. T.	—
L-ラムノース	—	—	N. T.
シトラコン酸	+	—	N. T.
ベンゾイルギ酸	—	—	—
ブチルアミン	—	+	N. T.
m-イノシトール	—	—	—
L-マンデル酸	—	—	—
トリブタミン	—	—	N. T.
イソ酪酸	—	+	N. T.
セバシン酸	—	—	+

ソルビトール	—	—	—
エリスリトール	—	—	N. T.
L-メチオニン	N. T.	—	N. T.
アセトアミド	N. T.	—	—
イタコン酸	N. T.	—	N. T.
ピメリン酸	N. T.	—	N. T.
シュクロース	N. T.	—	—
アゼライン酸	N. T.	—	+
D-ガラクトース	N. T.	N. T.	+
ムコン酸	N. T.	N. T.	+
グラニオール	N. T.	N. T.	+
プロピレングリコール	N. T.	N. T.	+
n-プロパノール	N. T.	N. T.	+

N. T. : 試験を行っていない

以上の菌学的性質をバーギーの細菌分類書 [Bergey's manual of Systematic Bacteriology (1986)] に基づいて分類すると、TRB-2、TRP-4はシュドモナス プチダ (*Pseudomonas putida*) と同定された。TRP-13株は明確に該当する種がなく、シュドモナス属 (*Pseudomonas* sp.) に属する新菌種であることが明らかとなった。

【0019】本発明に用いる微生物を培養するための培地は、その微生物が増殖しうるものであれば特に制限はない。例えば、炭素源としては、上記微生物が利用可能であればいずれも使用でき、具体的には、グルコース、フルクトース、シュクロース、デキストリンなどの糖類、ソルビトール、グリセロール、1,2-プロパンジオール、1,3-プロパンジオール、1,2-ブタンジオール、2-アミノ-1-プロパノール、2-アミノ-1-ブタノールなどのアルコール類、フマル酸、クエン酸、酢酸、プロピオン酸などの有機酸類およびその塩類、パラフィンなどの炭化水素類など、あるいはこれらの混合物を使用することができる。窒素源としては例えば、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、リン酸アンモニウムなどの無機酸のアンモニウム塩、フマル酸アンモニウム、クエン酸アンモニウムなどの有機酸のアンモニウム塩、肉エキス、酵母エキス、コーンステープリカー、カゼイン加水分解物、尿素、などの無機有機含窒素化合物、あるいはこれらの混合物を使用することができる。他に無機塩、微量金属塩、ビタミン類など、通常の培養に用いられる栄養源を適宜混合して用いることもできる。また、必要に応じて微生物の増殖を促進する因子、本発明の目的化合物の生成能力を高める因子、あるいは培地のpH保持に有効なCaCO<sub>3</sub>などの物質も添加できる。

【0020】培養方法としては培地pHは3.0~10.0、好ましくは4~8、培養温度は20~45℃、好ましくは25~37℃で、嫌氣的あるいは好氣的に、その微生物の生育に適した条件下5~120時間、好ましくは12~72時間程度培養する。

【0021】式(I)又は(II)で表わされるアルコールのエナンチオマー混合物から式(III)又は(IV)で表わされる光学活性なアルコールを生成する方法としては、培養液をそのまま用い、該培養液に式(I)又は(II)で表わされるアルコールのエナンチオマー混合物を添加する方法、遠心分離などにより、菌体を分離し、これをそのまま、あるいは洗浄した後、緩衝液、水などに再懸濁したものに、式(I)又は(II)で表わされるアルコールのエナンチオマー混合物を添加し反応させる方法などがある。この反応の際、グルコース、シュクロースなどの炭素源をエネルギー源として添加したほうがよい場合もある。また、菌体は生菌体のままでもよいし、菌体破砕物、アセトン処理、凍結乾燥などの処理を施したものでよい。また、これらの菌体あるいは菌体処理物を、例えばポリアクリルアミドゲル法、含硫多糖ゲル法(カラギーナンゲル法など)、アルギン酸ゲル法、寒天ゲル法など公知の方法で固定化して用いることもできる。さらに、菌体処理物から、公知の方法を組み合わせる精製取得した酵素も使用できる。

【0022】式(I)又は(II)で表わされるアルコールのエナンチオマー混合物はそのまま、あるいは水に溶解し、または反応に影響を与えないような有機溶媒に溶解したり、界面活性剤などに分散させたり、反応始めから一括にあるいは分割して添加してもよい。反応はpH3~10、好ましくはpH5~9の範囲で、温度は10~60℃、好ましくは20~40℃の範囲で、1~120時間程度、攪拌下あるいは静置下で行う。基質である式(I)又は(II)で表わされるアルコールのエナンチオマー混合物の濃度は特に制限されないが、1~40重量%程度が好ましい。また必要に応じてNaOH、CaCO<sub>3</sub>、HCl、H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>などで反応液のpHを保持すると、良好な結果が得られる場合もある。

【0023】反応によって残存生成した式(III)又は(IV)で表わされる光学活性アルコールの採取は、反応液から直接あるいは菌体分離後、有機溶媒による抽出、蒸留、カラムクロマトグラフィーなどの通常の精製方法

を用いれば容易に行うことができる。また、反応の副生物にアルデヒド、ケトールが生じる場合には、亜硫酸水素ナトリウムで処理し、除去することも効果的な方法である。

#### 【0024】

【実施例】以下、実施例にて本発明を具体的に説明するが、本発明はこれら実施例にのみ限定されるものではない。尚、例中の％は特記しない限り重量基準である。

#### 【0025】実施例1～8

下記に示す菌体調製用培地50mlを500ml 容坂ロフラスコに分注し、121℃、15分間滅菌した。冷却後、シュードモナス スピーズ (*Pseudomonas* sp.) TRP-13株の前培養液（下記に示す前培養培地を用い、5ml/φ21mm試験管、30℃、24時間培養）を0.5ml植菌した。30℃、48時間振とう培養した後、遠心集菌し、生菌体を得た。これを脱イオン水に懸濁し、25mlとなるようにした。表1に示す各種ラセミ体アルコールの500mM 溶液をそれぞれ調製し（アミノアルコールの場合NaOHにて、中和し、pH7とした）、菌体懸濁液2.5ml、基質溶液2.5ml、CaCO<sub>3</sub> 0.05gを混合し、φ21mm試験管中30℃、12～24時間振とう反応させた。反応終了後遠心分離にて菌体を除去し上清を得た。得られた上清中のアルコールの光学純度、それぞれのエナンチオマーの収率を表2及び表3に示す条件でそれぞれ測定した。尚、光学純度の測定はす

べてダイセル化学工業（株）製光学分割カラムを用いる高速液体クロマトグラフィーによった（φ4.6×250mm）。測定結果を表1に示す。

#### 【0026】＜前培養培地＞

グルコース	0.5%
肉エキス	0.3%
酵母エキス	0.3%
ポリペプトン	0.5%
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.07%
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.13%
MgSO <sub>4</sub> ・7H <sub>2</sub> O	0.05%
pH7.2	

#### ＜菌体調製用培地＞

ラセミ 1,2-プロパンジオール	1.0%
肉エキス	0.1%
酵母エキス	0.1%
ポリペプトン	0.2%
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.07%
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.13%
MgSO <sub>4</sub> ・7H <sub>2</sub> O	0.05%
pH7.2	

#### 【0027】

#### 【表1】

TRP-13株 基質250mM、CaCO<sub>3</sub> 1%

		基 質	反応時間 (時間)	残 存 基 質			
				濃度 (mM)	収率* (%)	立体配置	光学純度 (%ee)
実 施 例	1	1,2-ブタンジオール	24	77	60	R	95.4
	2	1,2-ペンタンジオール	24	147	78	R	32.1
	3	1,2,4-ブタントリオール	12	67	54	R	>99.0
	4	1,2,6-ヘキサントリオール	12	116	93	R	>99.0
	5	3-クロロ-1,2-プロパンジオール	24	106	85	S	>99.0
	6	2-アミノ-1-プロパノール	24	148	90	R	51.2
	7	2-アミノ-1-ブタノール	24	206	100	R	24.9
	8	3-アミノ-1,2-プロパンジオール	24	188	100	R	43.5

注)

\*: 片方のエナンチオマー基準

#### 【0028】

#### 【表2】

## &lt;定量条件&gt;

	化 合 物	GC/LC	カ ラ ム *1	温 度	移 動 相 **
1	1,2-ブタンジオール	GC	Thermon 3000 5%	150℃	
2	1,2-ペンタンジオール	GC	Thermon 3000 5%	150℃	
3	1,2,4-ブタントリオール	LC	TSK-Gel ODS80-TM	40℃	純 水
4	1,2,6-ヘキサントリオール	LC	TSK-Gel ODS80-TM	40℃	純 水
5	3-クロロ-1,2-プロパンジオール	GC	Thermon 3000 5%	180℃	
6	2-アミノ-1-プロパノール	LC	TSK-Gel ODS80-TM	40℃	50mM KPB, pH2.5/NeCN[9:1] -0.5mM SDS
7	2-アミノ-1-ブタノール	LC	TSK-Gel ODS80-TM	40℃	50mM KPB, pH2.5/NeCN[4:1] -0.5mM SDS
8	3-アミノ-1,2-プロパンジオール	LC	TSK-Gel ODS80-TM	40℃	50mM KPB, pH2.5/NeCN[9:1] -0.5mM SDS

【0029】注)

\*1 Thermon 3000 5% :  $\phi 3 \text{ mm} \times 2.1 \text{ m}$ TSK-Gel ODS80-TM : 東ソー(株)製、 $\phi 4.6 \times 250 \text{ mm}$ \*2 KPB : カリウムリン酸緩衝液  
SDS : ドデシル硫酸ナトリウム

【0030】

【表3】

## 光学純度の測定条件

	化 合 物	カ ラ ム	誘導体 化 <sup>1)</sup>	温度	移 動 相
1	1,2-ブタンジオール	CHIRALCEL OD	Phcb	35°C	n-ヘキサン/2-プロパノール[16:3]
2	1,2-ペンタンジオール	CHIRALCEL OD	Phcb	26°C	同上 [9:1]
3	1,2,4-ブタントリオール	CHIRALCEL OB	Ac	40°C	同上 [19:1]
4	1,2,6-ヘキサントリオール	CHIRALCEL OD	Phcb	45°C	同上 [16:3]
5	3-クロロ-1,2-プロパンジオール	CHIRALCEL OD	Phcb	26°C	同上 [16:3]
6	2-アミノ-1-プロパノール	CHIRALCEL OD	Phcb	50°C	同上 [16:3]
7	2-アミノ-1-ブタノール	CHIRALCEL OD	Phcb	45°C	同上 [16:3]
8	3-アミノ-1,2-プロパンジオール	CHIRALCEL OD	Phcb	45°C	同上 [16:3]

実 施 例

## 【0031】注

\*1 Ac: 塩化アセチルを用いるアセチル化

Phcb: フェニルイソシアネートを用いるフェニルカルバモイル化

実施例9~16

実施例1~8のTRP-13株と同様にして、シュードモ

ナス プチダ (Pseudomonas putida) TRB-2株についても全く同様の方法にて、ラセミ体アルコールと反応させた。残存する光学活性アルコールの測定も同様に行なった。結果を表4に示す。

## 【0032】

【表4】

TRB-2株 基質250mM、CaCO<sub>3</sub> 1%

		基 質	反応時間 (時間)	残 存 基 質			
				濃度 (mM)	収率* (%)	立体配置	光学純度 (%ee)
実 施 例	9	1,2 -ブタンジオール	24	77	60	R	95.4
	10	1,2 -ペンタンジオール	24	202	100	R	23.8
	11	1,2,4 -ブタントリオール	12	53	42	R	>99.0
	12	1,2,6 -ヘキサントリオール	24	108	87	R	>99.0
	13	3-クロロ-1,2 -プロパンジオール	24	144	98	S	70.1
	14	2-アミノ-1 -プロパノール	24	119	95	R	>99.0
	15	2-アミノ-1 -ブタノール	24	124	93	R	88.0
	16	3-アミノ-1,2 -プロパンジオール	24	154	100	R	82.7

注)

\*: 片方のエナンチオマー基準

【0033】実施例17~24

実施例1~8のTRP-13株と同様にして、シュードモナス プチダ (*Pseudomonas putida*) TRP-4株についても全く同様の方法にて、ラセミ体アルコールと反応

させた。残存する光学活性アルコールの測定も同様にして行った。結果を表5に示す。

【0034】

【表5】

TRP-4株 基質250mM、CaCO<sub>3</sub> 1%

		基 質	反応時間 (時間)	残 存 基 質			
				濃度 (mM)	収率* (%)	立体配置	光学純度 (%ee)
実 施 例	17	1,2 -ブタンジオール	24	88	68	R	92.7
	18	1,2 -ペンタンジオール	24	194	85	R	9.3
	19	1,2,4 -ブタントリオール	12	63	51	R	>99.0
	20	1,2,6 -ヘキサントリオール	24	97	73	R	89.6
	21	3-クロロ-1,2 -プロパンジオール	24	112	85	S	90.2
	22	2-アミノ-1 -プロパノール	24	154	97	R	56.8
	23	2-アミノ-1 -ブタノール	24	213	97	R	14.6
	24	3-アミノ-1,2 -プロパンジオール	24	169	99	R	47.2

注)

\*: 片方のエナンチオマー基準

【0035】

【発明の効果】本発明の微生物を用いた光学活性アルコ

ールの製法は、簡便に光学純度の高い光学活性アルコールを製造することを可能にさせるものであり、工業的に

極めて有利である。

---

フロントページの続き

(51) Int. Cl. <sup>5</sup>

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

C 1 2 R 1:40)

(C 1 2 P 41/00

C 1 2 R 1:38)

(C 1 2 P 41/00

C 1 2 R 1:40)